






**ANTI-MONOCLONAL GLANGIOSIDE ANTIBODY, ITS PRODUCTION AND ITS USE AS TUMOR REMEDY****Publication number:** JP6046882**Publication date:** 1994-02-22**Inventor:** KURAUSU BOSURETSUTO; GEERUHARUTO  
ZEEMAN; BUORUFUGANGU DEIPORUTO**Applicant:** BEHRINGWERKE AG**Classification:**

**- International:** A61K39/395; A61P35/00; C07K16/28; C07K16/30;  
C12N5/10; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/08;  
G01N33/53; G01N33/574; G01N33/577; A61K38/00;  
C12R1/91; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/18;  
C12N5/10; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/08;  
G01N33/53; G01N33/574; G01N33/577; A61K38/00;  
(IPC1-7): C12N15/06; C12P21/08; A61K39/395;  
C12N5/20; G01N33/53; G01N33/574; G01N33/577;  
C12P21/08; C12R1/91

**- European:** C07K16/30**Application number:** JP19930057634 19930318**Priority number(s):** DE19924208795 19920319**Also published as:**

 EP0561183 (A1)  
 DE4208795 (A1)  
 EP0561183 (B1)  
 NO315089B (B1)  
 ES2121881T (T3)

more &gt;&gt;

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP6046882

Abstract of corresponding document: **EP0561183**

The invention relates to monoclonal antibodies which have high avidity and react specifically with gangliosides GD3 and GQ1b, and to the use thereof for detecting melanomas and other GD3 and GQ1b expressing tumours or tissues.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-46882

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 2 月 22 日

|                           |         |         |              |        |
|---------------------------|---------|---------|--------------|--------|
| (51) Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号    | 庁内整理番号  | F I          | 技術表示箇所 |
| C 1 2 P 21/08             |         | 8214-4B |              |        |
| A 6 1 K 39/395            | A D U E | 9284-4C |              |        |
| C 1 2 N 5/20              |         | 9281-4B | C 1 2 N 5/00 | B      |
|                           |         | 8931-4B | 15/00        | C      |

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 6 頁) 最終頁に続く

|              |                        |          |   |
|--------------|------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号    | 特願平5-57634             | (71) 出願人 | 390037969<br>ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシ<br>ヤフト<br>BEHRINGWERKE AKTIEN<br>GESELLSCHAFT<br>ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン<br>(番地なし) |
| (22) 出願日     | 平成 5 年 (1993) 3 月 18 日 | (72) 発明者 | クラウス・ボスレット<br>ドイツ連邦共和国デー-3550 マルブルク.<br>アンデアハウシユタト 64   |
| (31) 優先権主張番号 | P 4 2 0 8 7 9 5 : 3    | (74) 代理人 | 弁理士 高木 千嘉 (外 2 名)   |
| (32) 優先日     | 1992 年 3 月 19 日        |          |   |
| (33) 優先権主張国  | ドイツ (DE)               |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗-ガングリオシド抗体、その製造および腫瘍治療剤としての使用

(57) 【要約】

【構成】 ガングリオシド GD 3 および GQ 1 b と特異的に反応するモノクローナル抗体。

【効果】 メラノーマならびに GD 3 および GQ 1 b を発現する他の腫瘍および組織の検出および治療に使用できる。

(2)

特開平6-46882

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ハイブリドーマ2121 (DSM ACC 2036)。

【請求項2】 ハイブリドーマ2121 (DSM ACC 2036) から誘導されるモノクローナル抗体BW 2121。

【請求項3】 免疫適格性動物を、GD3および/またはGQ1bを含有する免疫原で免疫し、GD3およびGQ1bに特異的なハイブリドーマを単離する請求項3～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 請求項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体を使用する、メラノーマならびにGD3およびGQ1bを発現する他の腫瘍または組織の検出方法。

【請求項5】 請求項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体の1種または2種以上を含有する医薬組成物。

【請求項6】 請求項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体を1種または2種以上を含有する診断剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】腫瘍関連抗原に特異的なネズミモノクローナル抗体 (MAb) は、in vitroでの診断的検討において腫瘍マーカー試験およびin vivoでの診断においてイムノシンチグラフィの両者に使用される。MAbによって腫瘍の治療効果を達成しようとの試みは多いが、これまで多くの場合、臨床治療の所見では統計的な有意差は得られていない。これらの失敗の理由は、MAbによる腫瘍の不適当な浸透性、それらの免疫原性および低い細胞傷害能力ならびにそれらのある種の正常細胞との交差反応性にある。

【0002】ヒト腫瘍の不適当な浸透性は高用量のMAbの長期投与を反復することによって克服できる。しかしながら、これはMAbの免疫原性が低い場合にのみ可能である。このような低免疫原性の分子は、MAbの人化 (humanization) によって製造できる (Guessow, D. & Seemann, G., Methods in Enzymology, 203頁, 1991)。それらが相当するFc残基で提供されれば、human MAbはより大きな細胞傷害潜在能力をもつことになる。さらにMAbがなお高い腫瘍特異性および高い親和性をもっていれば、高い有効性を有する腫瘍治療剤の開発が可能になる。

【0003】ガングリオシドに対して高い親和性をもつMAbの製造を試みていて、本発明者らは、このMAbが関連正常ヒト組織とは一般に低い親和性を示し、有意に交差反応することを観察した。しかしながら驚くべきことに、本発明者らは、ガングリオシドGD3およびGQ1bと反応し、低いモル濃度でもメラノーマ細胞に高い細胞傷害活性を発揮する高い結合活性を有するにもか

かわらず、正常ヒト組織とはわずかな交差反応性しか示さないMAbの製造に成功したのである。ガングリオシドGD3およびGQ1bは構造的に密接に関連したガングリオシドである。ブダペスト協定に従い、MAb BW 2121を分泌するハイブリドーマ2121は、1992年3月5日、DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Mascheroder Weg 1 B, 3300 Braunschweig) に、寄託番号DSM ACC 2036として寄託された。

【0004】ハイブリドーマ2121は次のようにして製造できる。たとえばマウス、ラットまたはヒツジのような免疫適格性動物をGD3および/またはGQ1bを含有する免疫原、例えばメラノーマ細胞またはその抽出物で免疫し、免疫細胞をミエローマ細胞と融合して不死化し、生成したハイブリドーマクローンについてGD3およびGQ1bに特異的なMAbを分泌を試験する。別法としてその抗体の可変領域をコードする遺伝子を含有する遺伝子バンクを、免疫された哺乳動物の免疫細胞から組換えDNA法によって調製し、所望のMAb特異性をもつクローンをついで、この遺伝子バンクからたとえばファージスクリーニング技術を用いて単離し、クローン化することができる。

【0005】したがって、本発明は：ハイブリドーマ2121 (DSM ACC 2036)、ハイブリドーマ2121から誘導されるモノクローナル抗体BW 2121、ハイブリドーマ2121からのモノクローナル抗体によって認識されるエпитープに結合するモノクローナル抗体またはその部分に関する。本発明はさらにキメラ、人化、二特異性 (bi-specific) またはオリゴ特異性 (oligospecific) の性質をもつモノクローナル抗体およびその部分に関する。人化抗体は特に好ましいその例である。本発明はまた、本発明の抗体の製造方法、本発明の抗体の使用によりメラノーマならびにGD3およびGQ1bを発現する他の腫瘍または組織の検出方法、さらに相当する医薬組成物または診断剤に関する。

【0006】MAb BW 2121は以下の7つの特徴によっても定義できる。

1) このMAbはSvennerholm (J. Neurochem. 10:613-623, 1963) の命名法によればGD3およびGQ1bと呼ばれるガングリオシドとELISAおよびMagnaniのITLC試験 (Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., Ginsburg, V., Science 212:55-57, 1982) において反応する。これはGD1b、GD2、GT1b、GD1a、GM1、GM2およびGM3には結合しない。

【0007】2) 一連の10の凍結保存原発性メラノーマ腫瘍の免疫組織学的染色 (Dippold, W.G., Dienes, H.P., Kunth, A., Meyer zum Bueschenfeld, K.-H., Cancer Res. 45:3699-3705, 1985) に基づいて、MAb BW 2121は、10の腫瘍中6に均一に結合し、す

(3)

特開平6-46882

3

なわち>90%のメラノーマ細胞は均一に染色され; 10の腫瘍中の3はもっと弱い反応を示し、すなわち10~50%のメラノーマ細胞が明瞭な陽性反応を示す。10の原発性メラノーマ腫瘍の1つはこのMAbとは反応しなかった。かなりさらに不均一ではあるが、試験した14のメラノーマ転移癌の場合にも類似の反応プロフィールがみられる。この場合、MAb BW 2121は14の腫瘍中6において腫瘍細胞の>90%と反応する。14の転移細胞中の5では腫瘍細胞の5~50%が陽性で、一方3つの転移癌ではまったく反応を示さなかった。

【0008】3) 母斑細胞性母斑の免疫組織化学的検討では、以下の結果が得られた: MAb BW 2121は、4の境界母斑中3つと、14の複合母斑中13と、5の真皮母斑中3つと、11の異形成母斑中8つと、1つの先天性母斑の1つと、反応した。

【0009】4) 凍結保存正常ヒト組織の免疫組織化学的検討では、以下の結果が得られた: 検討した3つの皮膚サンプル中、基底細胞層、有棘細胞層およびメラノサイトはすべて完全に陰性であった。検討した内分泌臓器中、検討した2つの副腎の皮質および髄質はいずれも何ら反応を示さなかった。さらにグアマータイ細胞の2つのサンプル、甲状腺の4サンプルおよびランゲルハンス島の4サンプルが陰性であった。胃腸管の組織中、検討した3つの粘膜腺、1つの舌、2つの食道、十二指腸からの3つのサンプル、4つの胆嚢、4つの肝組織および4つの膵臓組織は、完全に陰性であった。結腸においては試験した4つのサンプルで杯細胞が弱く染色した。検討した2つの肺組織はいずれも陰性であった。尿生殖管の組織は完全に陰性であった。すなわち腎臓2、尿管2、精巣1、卵巣1および乳房組織4について試験した。試験したリンパ組織、たとえば脾臓(5サンプル)および扁桃(1サンプル)も陰性であった。試験した骨格筋および平滑筋組織、それぞれ2サンプルは陰性であった。結合組織は弱い反応を示した。

【0010】5) ヒト末梢血細胞(PBL)とのFACS分析では、このMAbはPBLの~10%と反応した。

6) 精製GD3を使用し、Harlow E. & Lane D. (CSHL, p23, 1988)の方法に従って固相ELISAによって測定した結合活性は、 $2.3 \times 10^8$  リットル/molの領域にある。

【0011】7) このMAbはMAb濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ まで補体原としてヒト血清(希釈1:4)の存在下に、GD3発現SK-Mel28細胞を溶解する。これらの実験はWelt, S., Craswell, E.A., Vogel, C.-W., Oettingen, H.F., Old, L.J. (Clin. Immunol. Immunopathol. 45: 214-229, 1987)が報告した試験に相当する細胞傷

4

害性試験で実施した。ヒト補体に結合し、したがって腫瘍細胞を殺滅する能力は、IgG3イソタイプの他のMAbもつ性質である。

【0012】上の1)~7)に記載したMAb BW 2121の性質は文献で知られているMAb、特にMAb R24 (Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T.C., Ikeda, H., Oettingen, H.F., Old, L.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6144-6148, 1980)に比較して、MAb BW 2121が優れたものであるとする。

【0013】一般にMAb BW 2121はMAb R24に比べて以下の利点を有する。

1) 正常組織との交差反応が少ない

すなわちMAb R24は、副腎の髄質ならびにグアマータイ細胞と反応する。それはさらに扁桃の上皮細胞および結合組織とも反応する。

2) 結合活性が大きい

MAb R24の結合活性は $2 \times 10^7$  リットル/molで、MAb BW 2121より1log小さい。

3) 細胞傷害の強度が改良されている

SK-Mel28メラノーマ細胞の20%補体依存性細胞溶解を達成するためには、 $10 \mu\text{g/ml}$ のMAb R24が必要であるのに対し、MAb BW 2121は $1 \mu\text{g/ml}$ で同じ効果を有する。

【0014】本発明のMAbは、したがってMAb BW 2121によって認識されるエピトープを発現する腫瘍のin vitroもしくはin vivo検出または治療に、特にメラノーマ並びにGD3およびGQ1bを発現する他の腫瘍または組織の検出に、特に適している。

【0015】生化学的に、例えばクロロホルム-メタノール-水のような有機溶媒による抽出を用いて単離できる抗原が、MAb BW 2121に均等な抗体またはその免疫学的に反応性の部分の製造または試験、および模倣体の製造に、特に適している。

【0016】本発明の抗体は、放射性同位元素特にTc-99mによって標識できる (Schwarz, A., Steintraesser, A., J. Nucl. Med. 28: 721, 1987)。常磁性化合物による標識はさらに可能性を提供する。

【0017】さらにMAb BW 2121の重鎖および軽鎖のV遺伝子は、Orlandi, R., Guessow, D., Jones, P.T., Winter, G. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, 1989)によって記載された方法で単離可能で、V遺伝子エクソンの本質的領域の核酸配列は、Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977)によって記載された方法で決定できる。核酸配列および相当するアミノ酸配列は、次の表1aおよび1bに示す。

【0018】

【表1】

[0019]

表 1 a

BW 2121 VH マウス

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | CAG | GTC | CAG | CTG | CAG | CAG | TCA | GGG | GGA | GGC | TTA | GTG | AAG | CCT | GGA | GGG | TCC |
| 1   | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Gly | Ser |
| 52  | CTG | ACA | CTC | TCC | TGT | GCA | GCC | TCT | AGA | TTC | ACT | TTC | AGT | ACC | TAT | GCC | ATG |
| 18  | Leu | Thr | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Arg | Phe | Thr | Phe | Ser | Thr | Tyr | Ala | Met |
| 103 | TCT | TGG | GTT | CGC | CAG | ACT | CCG | CGC | AAG | AGG | CTG | GAG | TGG | GTC | CGA | TAC | ATT |
| 35  | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Thr | Pro | Ala | Lys | Arg | Leu | Leu | Trp | Val | Ala | Tyr | Ile |
| 154 | AGT | AGT | GGT | GGT | GCT | AGC | ACC | TAC | TAT | CGA | GAC | AGT | GTA | AAG | GGC | CGA | TTC |
| 52  | Ser | Ser | Gly | Gly | Ala | Ser | Thr | Tyr | Tyr | Arg | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe |
| 205 | ACC | ATC | TCC | AGA | GAC | AAT | GCC | AAG | AAC | ACC | CTG | TAT | TTG | CAA | ATG | AGC | AGT |
| 69  | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Ser | Ser |
| 256 | CTG | AGG | TCT | GAG | GAC | ACG | GCC | ATG | TAT | TAC | TGT | GCA | AGA | GGA | GGG | TCC | AGG |
| 86  | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Gly | Ser | Arg |
| 307 | TAT | GCT | ATG | GAC | TAT | TGG | GGC | CAA | GGG | ACC | ACG | GTC | ACC | GTC | TCC | TCA |     |
| 103 | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |

(4)

特開平6-46882

特開平6-46882

BW 2121 VK マウス

[illegible]

50

に、特異的な弱い免疫原性しか示さないペプチドとして使用できる。またさらにMA b BW 2121によって特定されるエピトープに対する高い特異性と結合活性を有する模倣体は、Saragovi, H. U., Fitzpatrick, D., Raktabutr, A., Nakanishi, H., Kahn, M., Greene, M. (Science 253: 792-795, 1991) によって記載された方法を用い、有機化学合成によって製造できる。MA b BW 2121のマウスおよび人化V領域は、例えば酵

(6)

特開平6-46882

9

10

素または補体成分をコードするヌクレオチド配列と組換え技術によって連結させることができる。これらの構築体はDNAレベルで連結した場合には、ドイツ特許出願P41 06 389.9 (Ma 87 6) に人化αCEAおよびヒトβ-グルクロニダーゼの例で示されているように、機能性融合蛋白として発現させることができる。

【0021】以上、本発明を詳細に説明したが、本発明はさらに次の実施態様によってことを要約して示すことができる。

- 1. ハイブリドーマ2121 (DSM ACC 203 10 6)。
- 2. ハイブリドーマ2121 (DSM ACC 203 6) から誘導されるモノクローナル抗体BW2121。
- 3. 前項2記載のモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに結合するモノクローナル抗体およびその部分。
- 4. ガングリオシドGD3およびGQ1bに特異的に結合する前項2または3記載のモノクローナル抗体。

5. 抗体はキメラ、人化、二特異性またはオリゴ特異性抗体、好ましくは人化抗体である前項2または3記載のモノクローナル抗体およびその部分。

【0022】6. 免疫適格性動物を、GD3および/またはGQ1bを含有する免疫原で免疫し、GD3およびGQ1bに特異的なハイブリドーマを単離する前項3～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

- 7. 前項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体を使用する、メラノーマならびにGD3およびGQ1bを発現する他の腫瘍または組織の検出方法。
- 8. 前項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体の1種または2種以上を含有する医薬組成物。
- 9. 前項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体を1種または2種以上を含有する診断剤。
- 10. メラノーマならびにGD3およびGQ1bを発現する他の腫瘍または組織の検出のための前項2～5の少なくとも1つに記載のモノクローナル抗体の使用。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. <sup>6</sup> | 識別記号                  | 序内整理番号   | F I                   | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-----------------------|----------|-----------------------|--------|
| G 0 1 N 33/53              | D                     | 8310-2 J |                       |        |
| 33/574                     | A                     | 9015-2 J |                       |        |
| 33/577                     | B                     | 9015-2 J |                       |        |
| // C 1 2 N 15/06           |                       |          |                       |        |
| (C 1 2 P 21/08             |                       |          |                       |        |
| C 1 2 R 1:91)              |                       |          |                       |        |
| (72)発明者                    | ゲールハルト・ゼーマン           | (72)発明者  | ヴォルフガング・ディボルト         |        |
|                            | ドイツ連邦共和国デー-3550マルブルク、 |          | ドイツ連邦共和国デー-6500マインツ、ノ |        |
|                            | ヴァイスドルンヴェーク32         |          | イマンシユトラーセ1            |        |